Promega

技 术 手 册

StemElite™ ID 系统

产品 G9530 说明书

www.promega.com

修改于 01/10

Part# CTM307

StemElite™ ID 系统

全部技术文献均可在因特网上得到 www.promega.com/tbs。请访问该网站以保证您所使用的是这份技术手册是新版本。如有任何疑问，请联系Promega北京技术支持，发送电子邮件至chinatech@promega.com.cn。

1、概述……………………………………………………………………3

2、产品组成成分和储存条件……………………………………………5

3、仪器需求，软件和附属产品…………………………………………5

4、Matrix 标准化或光谱校正……………………………………………5

5、注意事项……………………………………………………………6

6、DNA 样品准备………………………………………………………..6

A、DNA 纯化……………………………………………………………6

B、DNA 定量……………………………………………………………7

7、使用 StemElite™ ID 系统进行 DNA 扩增的方法步骤……………………7

8、扩增片断检测，使用 Applied Biosystems 3130 或 3130*xl* Genetic Analyzer 和 ABI PRISM® 3100 或 3100-*Avant* Genetic Analyzer 仪器，使用数据采集软件（版本 2.0 和 3.0）…………………………………………………………………9

A、毛细管电泳样品制备…………………………………………………..10

B、毛细管电泳仪器需求…………………………………………………… 10

9、扩增片断检测，使用 ABI PRISM®310 Genetic Analyzer 仪器………………11

A、毛细管电泳样品制备…………………………………………………..12

B、毛细管电泳仪器需求…………………………………………………..12

10、数据分析……………………………………………………………13

A、下载 Panel 和 Bin 文件…………………………………………………….13

B、将 Panel 和 Bin 文件导入 GeneMapper® ID 和 GeneMapper® 软件……………..14

C、用 GeneMapper® ID 和 GeneMapper® 软件创建分析方法………………………..14

D、创建尺寸标准…………………………………………………………..17

E、数据处理……………………………………………………………17

F、获得基因型…………………………………………………………18

G、对照………………………………………………………………18

H、结果………………………………………………………………19

11、常见问题及解决建议……………………………………………….21

12、附录……………………………………………………………26

A、STR 基因座位信息……………………………………………………..26

B、分子量内标 600（Internal Lane Standard 600）……………………………28

C、StemElite™ ID 系统通用试剂（Master Mix）准备…………………………..28

D、缓冲液和溶液成分……………………………………………………29

E、相关文献……………………………………………………………29

F、相关产品……………………………………………………………………………30

1、 概述

细胞系错误辨识和交叉污染一直以来是研究人员关心和担忧的事情。例如，当用小鼠细胞做饲养细胞层增殖干细胞时， 干细胞很容易被污染。已报道不少实验室花费了大量的时间和精力在错误的细胞系上（1）。为此，美国国立健康研究院特意发布一个通知，强力建议研究人员在使用细胞系时进行鉴定（2）。遗传识别技术可以用来检验干细胞系质量，人类细胞系可以使用短串联重复（STR）基因座位来验证（3-5）。 STR 基因座位包含短的，重复的基因序列，一般长度为 3-7 碱基对。这些重复序列在人类全基因组里都有分布，可以作为高度多态性标记，并可通过聚合酶链式反应（PCR）方法来检测。STR 基因座位上的等位基因可以通过扩增区域内重复序列的拷贝数目的不同来区分，并且在凝胶电泳分离之后，可以通过荧光检测来区别。

早期主要使用 PowerPlex®1.2 系统来研究人细胞系的遗传特征。现有的大量数据来源于使用 PowerPlex®1.2 系统的 8 个 STR 基因座位和 Amelongenin 基因座位（6，7）。为了支持早期的努力，我们将 PowerPlex®1.2 系统的基因座位包含在了新的 StemElite™ ID 系统（a-d）中，并增加了一个额外的基因座位 D21S11，用于提高识别能力。

为了提供一个强力和完整的系统用于细胞系鉴定，我们研发出了 StemElite™ ID 系统，含有完整的试剂，可用于在实验室中进行人干细胞系的识别和鉴定，和检测污染细胞系的存在。此外，我们特意将一条敏感性的标记整合进了系统，该标记可特异性的检测鼠源（*Mus musculus*）DNA 的存在。系统提供的引物可同时扩增上述鼠源基因标记和人的基因座位。StemElite™ ID 系统提供了一个方便的室温反应系统，即在 5X 酶混合物中包括了热启动的 *Tag* DNA 聚合酶。这样就可以简单的一步添加 DNA 扩增必需的 *Tag* DNA 聚合酶，dNTPs，$MgCl_2$，和反应缓冲液。

StemElite™ ID 系统可以实现 10 个人基因座位（9 个 STR 基因座位，一个用于性别鉴定的 Amelongenin 基因座位）和一个鼠的基因座位的共同扩增和三色检测，包括 D21S11，TH01，TPOX，vWA，Amelogenin，CSF1PO，D16S539，D7S820，D13S317，D5S818 和一个鼠源基因座位。这些基因座位集合在一起，提供一个遗传识别谱，其随机匹配可能性为 $1/(2.92*10^9)$ ，同时可用于检测人细胞系中的 1%的污染性鼠源细胞。用于扩增 D21S11，TH01 和鼠源基因座位的引物带有荧光素标签（FL），用于扩增 TPOX，vWA 和 Amelogenin 基因座位的引物带有羧基四甲基罗丹明标签（TMR），而用于扩增 CSF1PO，D16S539，D7S820，D13S317，D5S818 基因座位的引物带有 6-羧基-4',5'

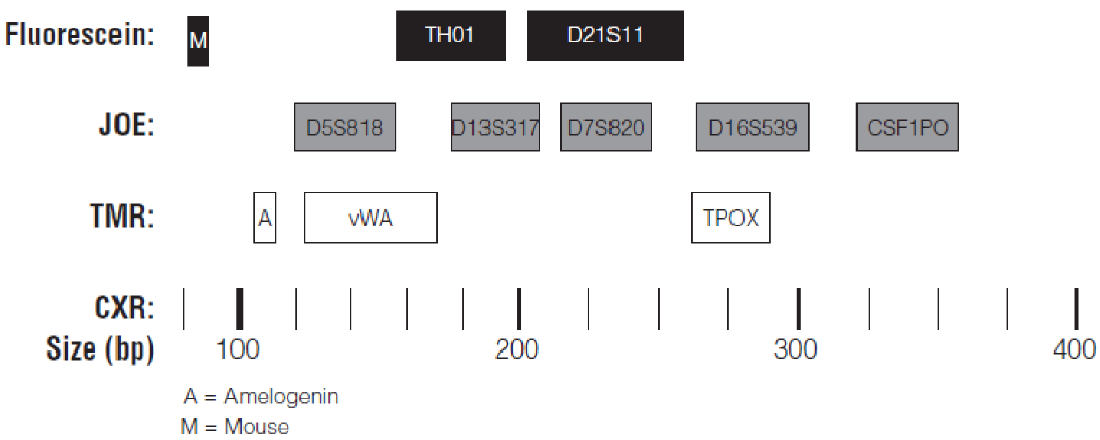

图 1. StemElite™ ID 系统的等位基因范围。

-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素标签（JOE）。这十一个基因座位在单个 PCR 管里同时被扩增，并且使用单次毛细管电泳进行分析。图 1 显示了 StemElite™ ID 系统中每个基因座位的等位基因分子量大小范围。

此外，StemElite™ ID 系统包含了各种不同的对照来增加所检测到的基因型的可信度。系统提供分子量内标（ILS）和等位基因分型标准物（allelic ladder）用于标准化，同时提供对照细胞系 DNA（9947A）作为阳性对照。每个扩增后的样品都得加入分子量内标，从而可通过毛细管电泳来确定每个扩增样品的分子量大小。等位基因分型标准物包含一个特定基因座位的所有主要的等位基因，可以作为识别每个等位基因的标准。而在每次电泳分析时都会以该等位基因分型标准物为对照，来消除每次电泳之间造成的差异。StemElite™ ID 等位基因分型标准物具体信息在 12.A 章节处，包括每个等位基因的分子量大小和重复数目。用于对照的 9947A DNA 是已知的基因型，可以用来验证基因型分析的准确性。

准备 DNA 样品

↓ 第 6 部分

建立扩增反应

↓ 第 7.A 部分

热循环

↓ 第 7.B 部分

设置仪器，准备样品

Applied Biosystems 3130 或 3130xl 遗传分析仪 第 8 部分	GeneAmp® 3100 或 3100-Avant 带收集数据软件 2.0 版的遗传分析仪	ABI PRISM® 310 遗传分析仪 第 9 部分

分析数据

第 10 部分	GeneMapper® ID 软件 3.2 版	GeneMapper® 软件，4.0 版

图 2. StemElite™ ID 系统的操作流程。

图2概述了这本技术手册中StemElite™ ID系统的操作流程。简要的说，先从细胞提取DNA，定量，然后加入通用试剂（Master Mix），通用试剂已经包含StemElite™ ID 10X引物对混合物，StemElite™ ID 5X 酶混合物和PCR级专用水。混匀，进行PCR反应，反应结束之后将分子量内标（ILS）加入PCR反应产物中。使用毛细管电泳技术（CE）对上述反应产物中的等位基因进行检测，获得CE数据，并用基因型分析软件进行分析，软件所需参数可以在Promega公司网页上获得：www.promega.com/stemeliteid/。网页上提供操作说明和应用实例，指导如何为GeneMapper®或GeneMapper®ID软件设置报告参数，使得基因型分析更加容易和精确。

这本技术手册包含独立的有关STR基因座位扩增和扩增产物检测的操作方法，这些操作方法在Promega公司都经过测试。想要了解更多的有关仪器和软件需求的信息，请参阅本书第三章节部分。

2、产品组成成分和储存条件

产品	包装	产品号
StemElite™ ID 系统	50 个反应	G9530

产品 G9530 包含的试剂足够做 50 次反应，每次反应使用 25 uL。包括：

扩增前使用试剂盒子（蓝色标记）：

250 ul　StemElite™ ID 5X 酶混合物
125 ul　StemElite™ ID 10X 引物对混合物
1.25 ml　PCR 级专用水
25 ul　9947A DNA （10 ng/uL)

扩增后使用试剂盒子（米色标记）：

25 uL　StemElite™ ID 等位基因分型标准物
150 ul　分子量内标（ILS）600

储存条件：所有产品成分储存于-20°C 非自动除霜冰箱。StemElite™ ID 10X 引物对混合物、StemElite™ ID 等位基因分型标准物和分子量内标（ILS）600 对光敏感，需要避光保存。我们强烈建议扩增前使用试剂盒子和扩增后使用试剂盒子分开储存和使用，枪头，试管架等等都要分开。使用有效期见产品标签。

3、仪器需求，软件和附属产品

手册涵盖使用9700和9600型GeneAmp® PCR仪器来应用StemElite™ ID系统的操作方法，此外还有使用ABI PRISM® 310，3100，3100-*Avant* Genetic Analyzers 和Applied Biosystems 3130，3130*xl* Genetic Analyzers 等仪器进行毛细管电泳分离和检测扩增样品的操作方法。这些操作方法在Promega公司都经过检测验证。如果用户实验室使用的PCR仪器和检测仪器跟手册所述的机型不一样，用户需要对其操作方法进行优化，包括改变PCR循环次数和注射时间。关于荧光检测仪器的操作方法需要从仪器生产商获得。

颜色分离矩阵的初始设置需要一个矩阵标准化包（Matrix Standards），该矩阵标准化包是单独出售的，目前可以获得的有下述机型：ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (PowerPlex® Matrix Standards, 310, 目录号DG4640)，ABI PRISM® 3100，3100-*Avant* Genetic Analyzers 和 Applied Biosystems 3130，3130*xl* Genetic Analyzers (PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130, 目录号DG4650)。

4、Matrix 标准化或光谱校正

Matrix文件的正确创建对于使用ABI PRISM® 310, 3100，3100-*Avant* Genetic Analyzers 和 Applied Biosystems 3130 和 3130*xl* Genetic Analyzers 来评估多色荧光系统是非常关键的。每台仪器都需要创建一个Matrix，如果Matrix不好或不正确，光谱上高峰值之间就不能很好的区分，一种颜色的一个等位基因高峰就可能会和另外一种颜色交叉重叠。

PowerPlex® Matrix Standards 310（目录号：DG4640）要求应用于 ABI PRISM® 310

Genetic Analyzer 的 Matrix 标准化。为了取得最佳结果，PowerPlex® Matrix Standards 3100/3130（目录号：DG4650）不应该用于 ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer 创建 Matrix 文件。

PowerPlex® Matrix Standards 3100/3130 （目录号：DG4650）要求用于 ABI PRISM® 3100/3130 Genetic Analyzer 和 Applied Biosystems 3130/3130*xl* Genetic Analyzers 的光谱校正，而为了取得最佳结果，PowerPlex® Matrix Standards 310（目录号：DG4640）不能用于上述这些机器创建 Matrix 文件。

关于Matrix标准化的操作流程和更多产品信息请阅读*PowerPlex® Matrix Standards, 310, Technical Bulletin* #TBD021,该技术手册随产品DG4640一起提供。关于光谱校正的操作流程和更多产品信息请阅读*PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130, Technical Bulletin* #TBD022，该技术手册随产品DG4650一起提供。这些技术手册均可登陆网站查阅：**www.promega.com/tbs/**，或直接向Promega公司索取。

5、注意事项

提纯DNA样品的质量，缓冲液的微小变化，离子强度，引物浓度，PCR仪器的选择和PCR循环条件都会影响最终结果的成功与否。我们建议用户严格按照推荐的PCR扩增操作流程来进行实验，之后毛细管电泳和荧光检测试验部分也是如此。

基于PCR的STR分析很容易因微量的非模板人源DNA污染而出错。所以在准备DNA样品，添加引物对和做PCR反应，以及分析扩增后样品这些过程都必须非常小心，避免交叉污染。扩增前使用的反应试剂（StemElite™ ID 5X Enzyme Mix, StemElite™ ID 10X Primer Pair Mix, Amplification Grade Water 和 9947A DNA）装在一个单独的盒子里，需要与扩增后使用的反应试剂（StemElite™ ID Allelic Ladder和Internal Lane Standard 600）分开储存。应该总是同时进行一个阴性对照反应（无模板）来检测试剂是否污染。我们极力推荐使用手套和抗气溶胶的枪头（如ART®枪头）。

用于 STR 产物分析的某些反应试剂是有害的，需要相应操作。甲酰胺是有刺激性的致畸剂，避免吸入及与皮肤接触。操作该试剂时，阅读警告标志，采取正确的预防措施，始终戴手套和保护眼镜。

6、DNA 样品准备

6.A、DNA 纯化

DNA 浓度，纯度和完整性对于使用 StemElite™ ID 系统成功获得结果是很重要的。DNA 不应该被剪切，而且不应该被蛋白和盐污染。低质量 DNA 可能导致背景增加或扩增失败，反应中太多或太少 DNA 都会导致扩增失败，表现为好几种结果：无法扩增出所有基因座位，或者所有等位基因扩增半途而废，或者部分等位基因扩增半途而废。

MagneSil® Genomic, Fixed Tissue DNA Purification System (目录号：MD1490), Wizard® SV Genomic DNA Purification System (目录号：A2360), Wizard® Genomic DNA Purification System (目录号：A1620)和Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit (目录号：AS1140)，这些可以购买到的DNA纯化系统均可产出高质量的DNA用于StemElite™ ID 系统。上述系统可以纯化出使STR分析容易和有效的干净的DNA。MagneSil®树脂可以去除

DNA样品中经常遇到的PCR反应抑制物和污染物。

DNA 应保存于低 EDTA 浓度的 TE 缓冲液（pH8.0）中。我们推荐 TE 缓冲液（10 mM Tris-HCl,0.1 mM EDTA [pH8.0]），高盐浓度或 pH 改变均会影响扩增。如果 DNA 模板保存于 pH 不是 8.0 或高 EDTA 浓度的 TE 缓冲液中，那么 DNA 模板的体积不应多于扩增反应总体系的 20%。因吸取模板带过来的 K^+，Na^+，Mg^+ 或 EDTA 均会对 PCR 反应造成负面影响。

6.B、DNA 定量

我们推荐在使用 StemElite™ ID 系统之前，先对 DNA 样品进行定量，因为过多或过少 DNA 都会导致反应失败。请使用推荐的模板 DNA 量。当过少的模板 DNA 用于扩增时，会出现引起失衡的随机效应，而当过量的模板 DNA 用于扩增时，较大的 STR 基因座位的扩增拷贝数会减少。可用 260nm 波长处的紫外吸收值估算 DNA 浓度，1 AU 等于 50 微克双链 DNA/毫升。Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA quantitation assay 试剂盒(Invitrogen)也可用于估算 DNA 浓度。每个 StemElite™ ID 系统反应请使用 2 纳克 DNA。

注意：

a、StemElite™ ID 系统可以检测到 20 皮克那么小的鼠源 DNA 的存在。

b、如果你不使用上述提到的 DNA 纯化试剂盒纯化 DNA，我们推荐测量 260nm 和 280nm 处的紫外吸收波长来确保 DNA 的纯度。高质量 DNA 的 A_{260}/A_{280} 比值应是 1.8。DNA 样品不纯的话，会导致扩增反应失败。注意，如果 A_{260}/A_{280} 比值低的话，DNA 浓度会被高估。

c、和其它模板或之前扩增 DNA 样品的交叉污染会引起样品中出现额外的峰。当使用 StemElite™ ID 系统时，请使用抗气溶胶的枪头，并经常更换手套。

7、使用 StemElite™ ID 系统进行 DNA 扩增的方法步骤

需要用户自己提供的材料：

- 9600 或 9700 型 GeneAmp® PCR 仪器（Applied Biosystems）
- 0.2ml 薄壁微型离心管，MicroAmp®光学 96 孔反应板或者 0.2ml MicroAmp® 8-strip 反应管（Applied Biosystems）
- 1.5ml 棕色离心管（Fisher 目录号：05-402-26）
- 抗气溶胶枪头

StemElite™ ID 系统经过优化可以在 25 微升反应体系中以 2 纳克 DNA 为模板进行扩增反应，具体操作细节见下面。较小的基因座位更容易被扩增出来，如果使用的模板 DNA 量多于推荐的 2 纳克，那么就会出现相对较高的较小基因座位峰和相对较低的较大基因座位峰。可以减少模板 DNA 量或 PCR 循环数来纠正这种情况的发生。

本手册提供了在 9600 或 9700 型 GeneAmp® PCR 仪器上使用 StemElite™ ID 系统的优化操作流程。

7.A、扩增准备

注意：

a、将扩增前使用的试剂和扩增后使用的试剂放在不同的房间里，在专门用于扩增准备的房间里准备扩增反应，并使用专门用于扩增准备的仪器和材料。

b、和其它模板或之前扩增 DNA 样品的交叉污染会引起样品中额外的峰出现。当使用

StemElite™ ID 系统时，请使用抗气溶胶的枪头，并经常更换手套。

1、将 StemElite™ ID 5X 酶混合物和 StemElite™ ID 10X 引物对混合物解冻。

注意：在使用之前震荡 15 秒，不要离心 StemElite™ ID 10X 引物对混合物，因为这样可能会使引物集中在管的底部。

2、确定准备反应的数目，应该包括阴性对照和阳性对照反应。可以增加一个或两个反应来补偿吸取样品时造成的误差。虽然这样会浪费少量的试剂，却可以确保 PCR 通用试剂的量足够用于所有的样品，同时保证每个反应使用相同的通用试剂。

3、将干净的 0.2ml 反应管放于试管架上，正确标记。也可以使用 MicroAmp®光学 96 孔反应板或者 0.2ml MicroAmp® 8-strip 反应管，并正确标记。

4、将表 1 列出的每样试剂加于一个无菌的，1.5ml 棕色离心管，轻轻地混匀。12.C 部分有一张工作表格可以计算用于多个反应的 StemElite™ ID 通用试剂(master mix)的体积。

表 1. 用于 StemElite™ ID 系统的 PCR 通用试剂（master mix）

PCR 通用试剂成分	每个反应所需体积
StemElite™ ID 5X 酶混合物	5.0 微升
StemElite™ ID 10X 引物对混合物	2.5 微升
PCR 级专用水	补足最终体积到 25 微升
模板 DNA（2 纳克）[1]	最多 17.5 微升

[1] 模板 DNA 在第 7 步时加。

扩增用的模板量多于 2 纳克，会导致结果中基因座位之间的峰值失衡。较小基因座位比较大基因座位具有更高的扩增产量。减少 2-4 个扩增反应的循环数（如 10/20，10/18 循环）能够改善基因座位之间峰值的平衡。

5、震荡 PCR 通用试剂 5-10 秒。

6、将 PCR 通用试剂加入每个反应管。

7、吸取模板 DNA（2 纳克）加入各自对应的已加 PCR 通用试剂的反应管里。

8、对于阳性对照反应，在一定体积中稀释 9947A DNA 至 2 纳克，然后将 2 纳克 DNA 加入含有 PCR 通用试剂的反应管里。

9、该步骤为可选的。如果想要做一个鼠源 DNA 的阳性对照，稀释 100 皮克鼠源基因组 DNA（目录号：G3091，需要另外购买）至模板 DNA 所需体积，然后吸取 100 皮克 DNA 加入到含有 PCR 通用试剂的反应管里。

10、对于阴性对照反应，吸取 PCR 级专用水（替代模板 DNA）加入已加 PCR 通用试剂的反应管里。

7.B、扩增热循环

本手册包含在 9600 或 9700 型 GeneAmp® PCR 仪器上使用 StemElite™ ID 系统的操作流程。我们没有测试其它的反应管，反应平板和 PCR 仪器。想要获得关于其它 PCR 仪器的信息，请通过 E-mail 联系 Promega 技术支持部门：chinatech@promega.com.cn。

您使用的扩增仪器和检测仪器可能会不一样，所以需要根据实验室所用仪器进行操作流程的优化，包括调整 PCR 循环数目和毛细管电泳时样品注入时间（上样体积）。Promega 公司检测数据表明对于 2 纳克模板 DNA 来说，10/22 循环数较好。对于更多量模板 DNA 或者为了降低灵敏度，可尝试更少的循环数，如 10/16，10/18 或 10/20，具体条件需要评估。

1、将反应管或 MicroAmp®平板放入 PCR 仪器中。
2、选择对应的 PCR 操作流程进行 PCR 反应。适用于 9600 或 9700 型 GeneAmp® PCR 仪器的操作流程见下面。
3、PCR 反应结束后，将样品装于避光盒子里，置于-20°C 保存。

注意：将样品保存在 4°C 或更高温度，会引起样品降解。

9700 型 GeneAmp® PCR 仪器扩增反应操作流程	**9600 型 GeneAmp® PCR 仪器扩增反应操作流程**
96 °C 2 分钟，接着： ramp 100% 到 94°C，30 秒 ramp 29%到 60°C，30 秒 ramp 23%到 70°C，45 秒 上述三个步骤重复 10 个循环，接着： ramp 100% 到 90°C，30 秒 ramp 29%到 60°C，30 秒 ramp 23%到 70°C，45 秒 上述三个步骤重复 22 个循环，接着： 60°C 30 分钟 4°C 浸泡	96°C 2 分钟，接着： 94°C 30 秒，接着： ramp 60 秒到 60°C，持续 30 秒 ramp 50 秒到 70°C，持续 45 秒 上述三个步骤重复 10 个循环，接着： 90°C 30 秒，接着： ramp 60 秒到 60°C，持续 30 秒 ramp 50 秒到 70°C，持续 45 秒 上述三个步骤重复 22 个循环，接着： 60°C 30 分钟 4°C 浸泡

8、扩增片断检测，使用 Applied Biosystems 3130 或 3130*xl* Genetic Analyzer 和 ABI PRISM® 3100 或 3100-*Avant* Genetic Analyzer 仪器，使用数据采集软件（版本 2.0 和 3.0）。

需要用户自己提供的材料：

- 95°C 干热器，水浴或者加热循环器
- 碎冰或者冰水浴
- 抗气溶胶枪头
- 3100 或 3130 毛细管整列，36 厘米规格
- 性能优化聚合物 4（POP-4™），用于 3100 或 3130
- 10 倍遗传分析器缓冲液（含有 EDTA）
- MicroAmp®光学 96 孔反应板和隔片
- Hi-Di™ 甲酰胺（Applied Biosystems 目录号：4311320）
- PowerPlex® Matrix Standards，3100/3130 （目录号：DG4650）

注意：

甲酰胺的质量非常关键，应使用电导率小于 100 μs/cm 的 Hi-Di™ 甲醛胺。分装的甲酰胺冻于-20°C 保存。反复冻融和在 4°C 长期保存都会导致甲酰胺的分解。电导率高于 100 μs/cm 的甲酰胺含有注入样品时会与 DNA 竞争的离子，会导致结果中峰值偏低和敏感性降低。更长的注入时间不会增加信号。

警告：甲酰胺是一种有刺激性的致畸剂，避免吸入和接触皮肤。阅读警告标志，操作该试剂时需采取正确的预防措施，总是戴手套和安全眼镜。

8.A、毛细管电泳样品准备

1、按以下方法将分子量内标和 Hi-Di™ 甲酰胺混合制备上样混合物：

[(0.5uL ILS600) x (#注入样品数)] + [(9.5uL Hi-Di™ 甲酰胺) x (#注入样品数)]

注意：上样混合物里分子量内标的用量可以增加或减少，来调整电泳结果中分子量标准物峰值的强度。分子量内标的最佳峰值是 500-1000 RFU。如果峰值过低，我们建议改变上样混合物里两者的比例，1uL ILS600 加 9uL Hi-Di™ 甲酰胺。如果峰值过高，我们建议两者使用比例为 0.25uL ILS600 加 9.75uL Hi-Di™ 甲酰胺。

2、震荡 10-15 秒。

3、吸取 10 微升甲酰胺/分子量内标混合物到每个上样孔。

4、往每个上样孔里加 1 微升扩增样品（或者 1 微升 StemElite™ ID 等位基因分型标准物），用相应的隔片将每个上样孔盖住。

注意：不同仪器的检测灵敏度不一样，所以需要调整注入时间或者样品上样量。使用数据采集软件里的“管理模块”可以调整注入时间或上样电压。也可以选择在扩增反应中使用更少的模板 DNA 或减少 2-4 个 PCR 循环数来达成所需的信号强度。

5、如果上样孔里有气泡，将板子简短的离心一下去除气泡。

6、样品 95°C 变性 3 分钟，接着立即放在碎冰上或冰水浴中 3 分钟。

注意：变性后的样品需要在 24 小时内使用。溶解于甲酰胺的扩增样品不可长期保存，会降解。重复步骤 1 到 6，可以再次使用新鲜的甲酰胺来准备样品。

8.B、毛细管电泳仪器准备

请阅读仪器用户手册来了解仪器清洗，安装毛细管整列，空间校正，加聚合物这些过程的操作方法。按照制造商的建议来保存聚合物和了解保存期限。室温保存聚合物超过一周会导致颜色通道中出现宽峰或裂峰或额外的峰。根据制造商建议维护仪器日常使用，从而获得最佳结果，较小仪器相关误差。用于仪器或稀释 10 倍遗传分析器缓冲液的水里的污染物会产生蓝色和绿色的峰。请使用灭菌水。

按照ABI PRISM® 3100 或 3100-*Avant* Genetic Analyzer的用户使用手册，使用数据采集软件（版本2.0）来分析样品。如果使用Applied Biosystems 3130 或 3130*xl* Genetic Analyzer分析样品时，需注意一些事项。

1、在管理模块（Module Manager）中，选择“New”选项。接着在 Type 下拉菜单中选择

"Regular", 并在 Template 下拉菜单中选择"HIDFragmentAnalysis36_POP4"。确认注入时间为 5 秒，注入电压为 3kV, 把运行时间延长至 2000 秒。 给所运行的模块命名，选择"OK"。

注意： 仪器的灵敏性可能不同，注入时间和电压可在"Module Manager"进行调整。建议注入时间 3-22 秒，注入电压 1-3kV

2、在 protocol manager 中选择"New"，为你的方法（protocol）命名。在 Type 下拉菜单中选择"Regular"并在运行模式 Run Module 下拉菜单中选择前面新建的运行模式。最后在 Dye-Set 下拉菜单中选择"F"。确认"OK"

3、 按照仪器使用说明所描述在 Plate Manager 中创建一个新的 plate 记录。在出现的对话框中找到"Application"下拉菜单并选择"GeneMapper-Generic"，接下来选择合适的 plate 型号（如 96 孔板）。在所有者（owner）和操作员（operator）窗口中输入相应内容后确认（选择 OK）。

注意：如果需要自动分析样品数据，请参考仪器使用说明（instrument user's manual）。

4. 对 GeneMapper 的 plate 记录来说，在相应的孔（cell）中输入相应的样品名称。滚动至右边的"Results group 1"，选择需要的结果组（results group）。在"Instrument Protocol 1"栏目中，选择步骤 2 中创建的方法（protocol），并确保样品名称各列都含有此信息。确认（选择 OK）。

注意：在新建"New"下拉菜单中创建新的结果组（results group），在 General 对话框中输入名称， 找到 Analysis 对话框，并在 Analysis 下拉菜单中选择"GeneMapaper-Generic"

5. 把样品放入仪器，关闭仪器门。
6. 在波长浏览（spectral viewer）中确认 dye set F 处于激活状态，并为其设定正确的校准活性。
7. 打开运行设置（run scheduler）， 找到在步骤 3、4 中创建的 plate 记录（record）， 选中 plate 记录，单击与含有扩增样品相对应的 plate 图表（graphic）。当 plate record 与相应的 plate 关联后 plate graphic 将由黄色变成绿色， 此时绿色的 Run Instrument 箭头也会变成可执行状态。
8. 单击工具栏上 Run Instrument 箭头，开始运行样本。
9. 通过对数据收集软件中 run, view, array 或者 capillaries viewer 窗口的观察监视电泳运行状态。每次注入约耗时 45 分钟。

注意：如果峰值太低或者缺失，可通过延长注入时间和/或 增高电压的方式重新注入样品。 如果 ILS600 失真，检查激光电源。

9、扩增片断检测，使用 ABI PRISM®310 Genetic Analyzer 仪器

需要使用者准备的材料

- 95℃加热器（heating block）， 水浴锅或热循环仪
- 310 毛细管，47cm×50μm
- 分辨率得到优化过的 polymer4（POP-4™）

- 玻璃注射器（1ml）
- 10×含有 EDTA 的 Genetic Analyzer 缓冲液
- 样品管和隔片（septa）
- 抗气溶胶枪头
- Hi-Di™ 甲酰胺（Applied Biosystems 目录号：4311320）
- PowerPlex® Matrix Atandards, 310（目录号：DG4640）
- 碎冰或冰水浴

甲酰胺的品质至关重要。应使用电导低于 100μS / cm 的 Hi-Di™ 甲酰胺，分装后保存在-20℃。反复冻融或者长期在 4℃会使甲酰胺降解。电导高于 100μS / cm 甲酰胺可能含有与 DNA 竞争的金属离子，从而使数据的峰值减小，降低灵敏度，这样即使延长注入时间也可能不会提高信号。

注意：甲酰胺具有刺激性和致畸作用，避免吸入，不要与皮肤接触。阅读注意事项，在操作前做好相应的准备措施。操作甲酰胺时务必带手套和护目镜。

9. A 毛细管电泳样品制备

1. 准备上样溶液。 按下面的方法混合 Internal Lame Standard 600 （ILS600）和 Hi-Di™ 甲酰胺：[(1.0μl ILS 600) × (# injections)] + [(24.0μl Hi-Di™ 甲酰胺) × (# injections)]

注意：标准峰的强度可以通过增加或降低 ILS600 的用量来调整。100-base 片段的最佳峰高在 500—1000RFU 之间。如果峰太低建议 ILS600 和 Hi-Di™ 甲酰胺分别调整至 1.5μl 和 24μl。如果峰太高建议 ILS600 和 Hi-Di™ 甲酰胺分别调整至 0.5μl 和 24.5μl

2. 震荡 10-15 秒。
3. 在 25μl 上样缓冲液中加入 1 微升扩增产物（或者 1 微升 StemElite™ ID Allelic Ladder）

注意： 由于仪器灵敏度的不同，注入时间或者扩增产物的量需要调整。 也可以降低模板用量，或减少 2-4 个扩增循环数来获得需要的信号强度。

4、 如果需要，可离心除去孔中气泡。

5、 95℃变性样品和分型标准物 3 分钟，立即放到冰上或冰水中冷却 3 分钟。

注意：不正确的变性会产生多余的峰。

6、 把试管放在合适的自动上样托盘中（48 或 96 孔）。

7、 把自动上样托盘（autosampler tray）放进仪器中，关上门。

注意：变性的样品板应该在 24 小时内使用，在甲酰胺中长时间的储存会造成 DNA 的降解。样品可以在新鲜的甲酰胺中重新制备。

9.B、毛细管电泳仪器的准备

参看仪器使用说明清洗 pump block、安装毛细管、标定 autosampler 和往注射器中加聚合物。聚合物的存放方法和存放时间参考生产厂商的建议。聚合物在室温存放超过一周会使一个或所有颜色通道的峰增宽、分裂、或出现杂峰。为尽量减少仪器噪声并获得最佳效果，要按照生产厂商的建议对仪器进行每周或每天的维护。如果含有污染物的水用于仪器或者用于

稀释 10×Genetic Analyzer 缓冲液会在绿色和蓝色染料通道出现杂峰。使用灭过菌的水。

1. 打开 ABI PRISM® 310 数据收集软件

2. 按照 ABI PRISM® 310 的使用说明准备 GeneScan® 样品表。在“sample info”中输入相应的样品信息。

3. 创建一个新的 GeneScan® 注入表单。 在下拉菜单中选择合适的样品表单。

4. 在下拉菜单中选择 “GA STR POP4（1ml）A”模式。 把注入时间和运行时间分别改为 3 秒和 30 分钟。 其他参数设置如下：

Inj. Secs: 3
Inj. kV: 15.0
Run kV: 15.0
Run °C: 60
Run Time: 30

! 不同的仪器最优注入时间不同，当模板 DNA 为 2ng 时，建议注入时间为 2-5 秒。

注意： 长时间运行 ABI PRISM® 310 后，片段的迁移可能有所差异，这可能由于温度的变化或柱子（column）的变化造成。当分析多个样品时，在不同的时间注入等位基因分型标准物，有利于精确的对样品进行基因型分析。

5. 选择合适的 matrix 文件。
6. 如要自动分析数据， 在自动分析复选框中选择合适的分析参数和量化标准。具体参考 ABI PRISM® 310 的使用说明。
7. 在样品托盘（sample tray）中上样，关闭各个门，选择“Run”开始毛细管电泳。
8. 通过观察原始数据和状态窗口监测电泳状况。每个样品装注射器、注射和电泳总耗时约 40 分钟。

10、数据分析

解析StemElite™ ID系统生成的数据，需要用到GeneMapper®或者GeneMapper® *ID*软件。为了简化StemElite™ *ID*系统生成数据的分析过程，我们建立了panel和bin文件，用于GeneMapper® *ID* 软件3.2版本，和GeneMapper®软件4.0版本的基因型自动分配。我们推荐GeneMapper® *ID* 软件3.2版本的用户完成Applied Biosystems GeneMapper® *ID* 软件人类识别分析教程，从而熟悉该软件正确的操作方法。对于GeneMapper® *ID* 软件3.1版本的用户，我们推荐您将软件升级至3.2版本。

10.A、 下载 panel 和 bin 文件

1、从 promega 网站下载 GeneMapper® ID 和 GeneMapper®软件所用的 panel 和 bin 文件：**www.promega.com/stemeliteid/**
2、输入您的联系信息，并选择适当的分析软件，选择“submit”
3、选择“StemElite ID Panels and Bins set”链接，将压缩软件存入您的电脑。

4、用 Windows®的 WinZip 软件打开压缩文件，将解压后的文件存入电脑的已知路径。

10.B、 将 panel 和 bin 文件导入 GeneMapper® ID 和 GeneMapper®软件

以下说明与 Applied Biosystems GeneMapper® *ID* 软件教程 1 至 4 页和 GeneMapper®软件 4.0 版本的 *Microsatellite Analysis Getting Started Guide* 中的介绍大致相同。

1、 打开 GeneMapper® *ID* 软件 3.2 版本或者 GeneMapper®软件 4.0 版本
2、 选择“tools”，然后“panel manager”
3、 高亮左上方导航面板里的 Panel Manager 图标
4、 选择“File”，然后 “Import Panels”
5、 在 10. A 中的路径中找到 panel 和 bin 文件，选择“StemElite_ID_Panels_1.0.txt”，选择“Import”。
6、 在导航面板中高亮刚导入的 StemElite_ID_Panels_1.0.txt 文件夹
7、 选择“file”，然后“Import Bin Set”
8、 找到 panel 和 bin 文件，选择“StemElite_ID_Bins_1.0.txt”，然后“Import”
9、 在“Panel Manager”窗口底部选择“Apply”，然后“OK”，这时候“Panel Manager”窗口会自动关闭。

注：GeneMapper® *ID* 软件是专为法医实验室打造的软件。HID 分析设置能够使用 panel 和 bin 文件提供的一套样本中出现的等位基因的信息进行数据分析。HID 分析算法能够根据仪器的不同，使用等位基因分型标准物来计算等位基因迁移时发生的偏移或差异，从而允许软件校正由温度、电压、聚合物以及其他因素造成的微小偏差。其他版本的 GeneMapper®分析软件不包括这些选项。

其他版本的 GeneMapper®分析软件也可以用来分析 StemElite™ ID 系统的数据。但是使用其他版本软件时需要确保等位基因分型标准物和阳性对照对比的准确性。每一个毛细管电泳（CE）仪需要创建其特定的 panel 和 bin 文件，且文件不可相互替换。GeneMapper®软件无法计算偏差，因此需要自定义 panel 和 bin 文件，使之能够正确显示出片段在不同仪器上各自真实的迁移情况。

Promega 提供了用于生成这种在 StemElite™ ID 系统中使用的，能够自定义 panel 和 bin 文件从而正确显示片段在不同仪器上各自真实的迁移情况的自定义 bin 生成工具。此工具需要运行至少三次 StemElite™ ID 等位基因分型标准物分析的数据，promega 网站可以以表格形式输出该数据。在下述网址中包括使用说明和自定义 bin 生成工具：**www.promega.com/stemeliteid/**

10.C、 用 GeneMapper® *ID* 软件和 GeneMapper®软件创建分析方法

1、 选择“tools”，然后“GeneMapper Manager”
2、 选择 Analysis Methods 选项卡
3、 选择“New”，会弹出一个新的分析法对话框
4、 如果可选，选择“HID”，或者“Microsatellite”。选择“OK”
5、 为此分析法键入一个描述性的名称，如“StemElite_ID”
6、 选择 Allele 选项卡

7、 选择 StemElite™ ID 系统相关的 bin 文件集，“StemElite_ID_Bins_1.0”

注：如果使用的是GeneMapper® 分析软件而不是 GeneMapper® ID软件，您可以用上述10.B部分，步骤9提到的自定义bin生成工具来生成自定义的bin文件。

8、 确认选中“Use marker-specific stutter ratio if available”复选框

9、 使用StemElite™ ID系统时为了筛选到合适的峰，输入图3所示的，使用GeneMapper® ID软件和HID分析法显示的数值，或者图4所示的使用GeneMapper® 软件和Microsatellite (MS) 分析法显示的数值。

对于以上设置的恰当用法及作用的进一步解释，请查询Applied Biosystems用户手册中“Installation Procedures and New Features for GeneMapper ID Software 3.2”板块。

注：以上设置已有一部分进行过优化，可能与用户手册上的推荐设置有一定区别。

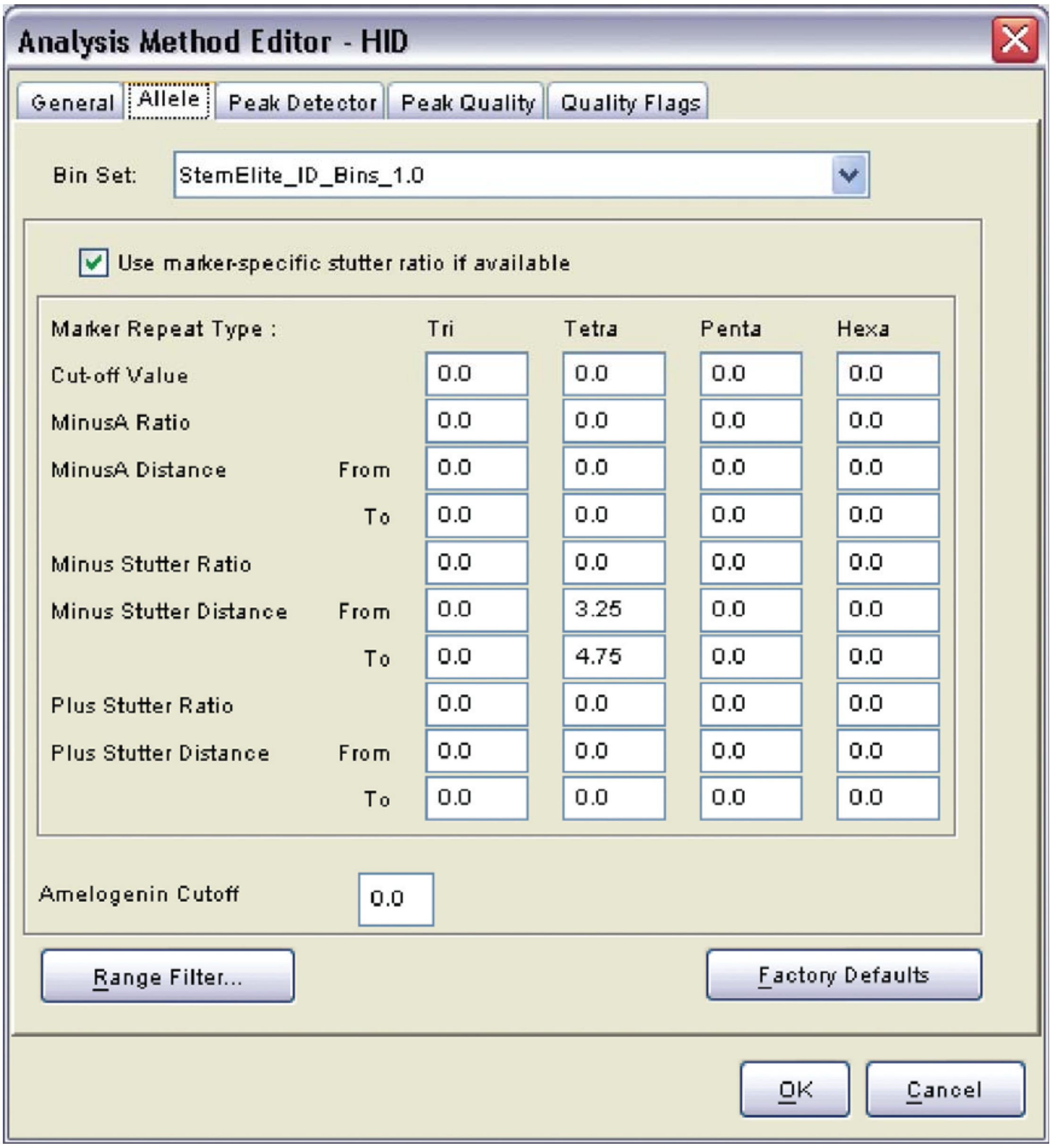

图3. **GeneMapper® *ID*分析法中的Allele**选项卡

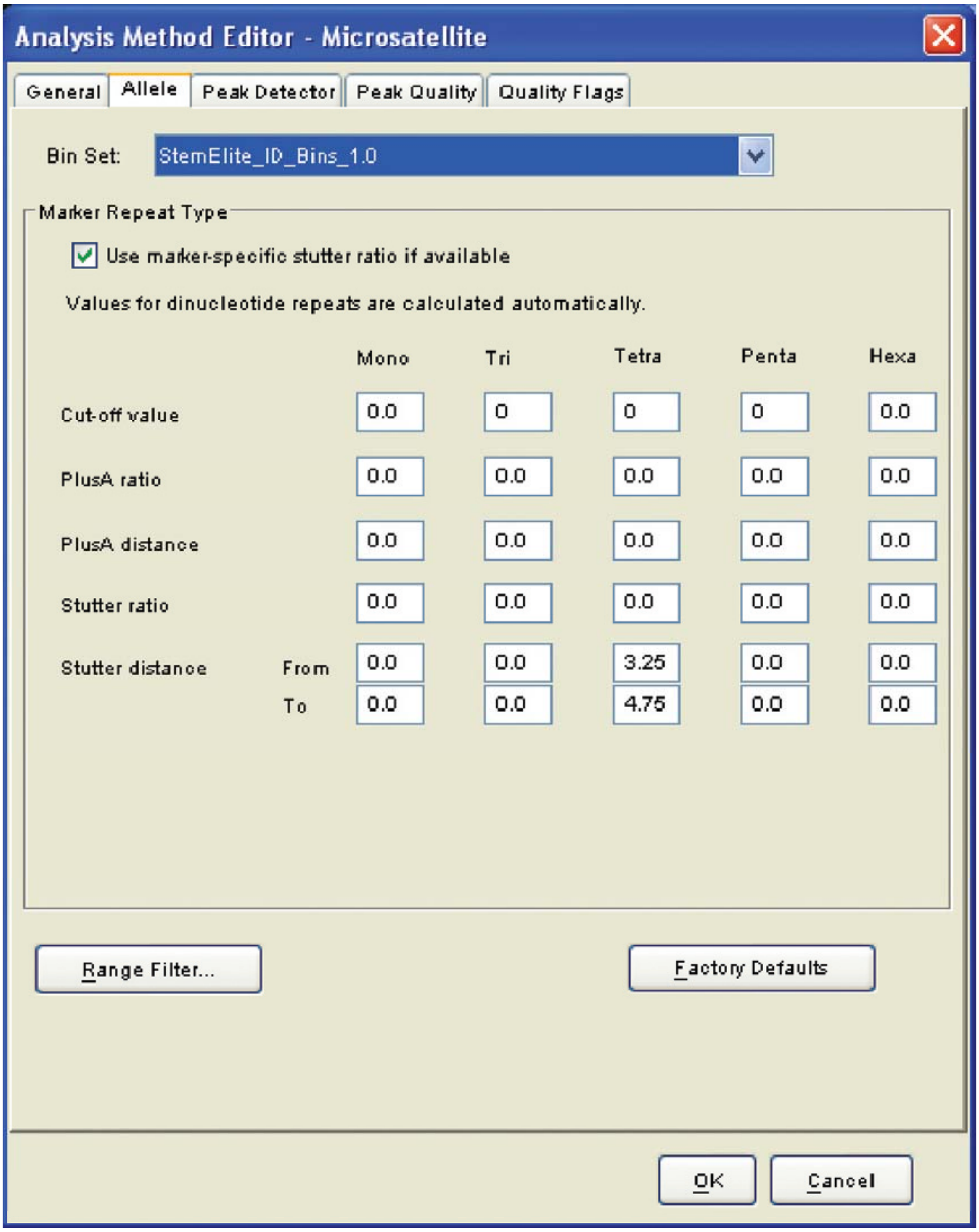

图4. **GeneMapper®分析法的Allele**选项卡。

10、选择Peak Detector选项卡，我们推荐图5显示的设置。

注意：

1. 选择分析范围的全部或者一部分。当选择部分范围时，应根据数据选择恰当的分析范围。在引物峰后面，第一个定义的分子量内标峰之前选择起始点，用于确定分子量内标的正确大小。
2. StemElite™ ID系统仅包括四核苷酸标记，其他重复类型的设置可忽略。

11、选择Peak Quality选项卡。此处您可以更改有关峰质量的设定。

注：关于步骤10和11，GeneMapper® *ID*用户手册中有更详尽的介绍。

12、选择Quality Flags选项卡。您同样可以更改其中的设定。

13、选择“OK”保存您的设置。

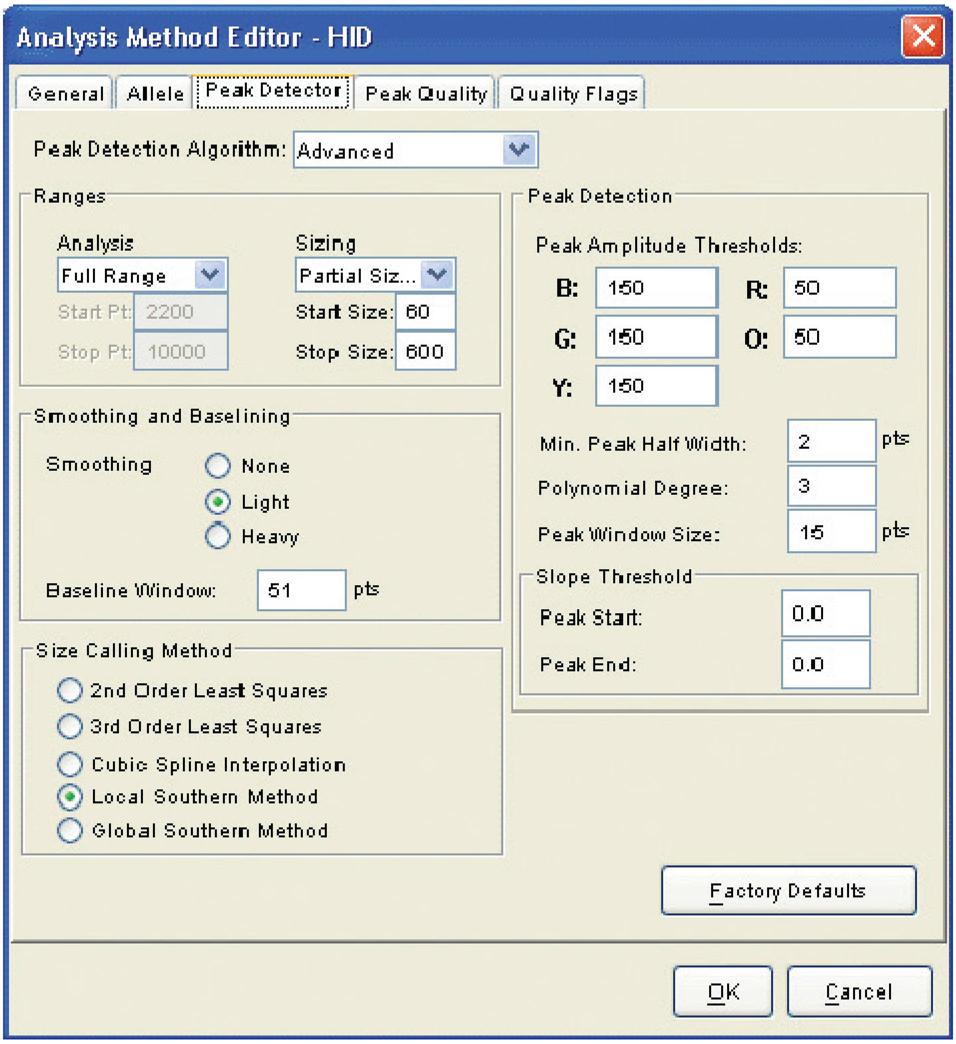

图5. **GeneMapper® *ID* and GeneMapper®分析法Peak Detector选项卡**

10.D、建立分子量标准

1、选择“tools”，然后“GeneMapper Manager”

2、选择 Size Standard 选项卡。

3、选择“New”

4、选择“Basic or Advanced”（图 5）。所选的分析法类型须与此前创建的分析法相匹配。选择“OK”。

5、在 Size Standard Editor 中键入详细的名称，如“ILS 600 advanced”。选择红色作为分子量标准的颜色。

6、输入分子量内标的大小。

7、选择“OK”。

10.E、数据处理

1、创建一个新的项目，导入样品文件，可以参照Applied Biosystems GeneMapper® *ID* 软件人类识别分析教程或*GeneMapper® Software Version 4.0 Microsatellite* 分析入门指导。

2、在“Sample Type”栏目的下拉菜单里，选择“Ladder”,“Sample”，“Positive Control”或“Negative Control”。项目里的每个文件夹必须包含至少一个等位基因分型标准物用于正确的基因型分析。

3、在“Analysis Method”栏目处，选择10.C部分创建的分析方法。

4、在“Panel”栏目处，选择“StemElite_ID_Panel_1.0”。该设置文件是在10.B部分导入的。

5、在“Size Standard”栏目处，选择10.D部分创建的分子量大小标准。

6、如果分析来自ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer的数据，确保在Matrix栏目处选择正确的Matrix文件。

7、选择“Analyze”（绿色箭头按钮）开始数据分析。

10.F、获得基因型

样品基因型在数据处理部分创建（10.E部分）。

1、 选择“View”栏目，接着选择“Genotypes”。项目中所有样品的基因型都会显示出来。

   或者，如果想看所有样品中的某一个样品或某一组样品的基因型结果，可以选择“Analysis”栏目，接着选择“Display Plots”。在“Sample Plot”窗口，选择“Genotype”。这样所选择的样品的基因型结果会显示出来。

2、 如果你使用GeneMapper® 软件，样品的等位基因被认为是“OL”（偏离等位基因分型标准物），bins文件不适合于你使用的仪器。GeneMapper® 软件不会与GeneMapper® ID 软件一样调整bins文件来匹配等位基因分型标准物。这时，访问Promega公司网页：**www.promega.com/stemeliteidapps/**，来创建适合你的仪器的bins文件。

10.G 对照

1、检查阴性对照的结果，阴性对照应该不能扩增样品。

2、检查 9947A 阳性对照DNA的结果。用基因座位特异性的等位基因分型标准物来比对阳性对照DNA的等位基因重复单元大小。预期的9947A DNA等位基因标识见表格2。

表格2、9947A DNA的预期等位基因标记

STR基因座位	等位基因
D21S11	30, 30
TH01	8, 9.3
TPOX	8, 8
vWA	17, 18
Amelogenin	X, X
CSF1PO	10, 12
D16S539	11, 12
D7S820	10, 11
D13S317	11, 11
D5S818	11, 11

10.H、结果

图6显示了使用StemElite™ ID系统产生的典型结果。StemElite™ ID 等位基因分型标准物见图7。

基因座位与基因座位之间峰值的失衡与细胞系DNA有关。正常的基因组DNA含有同等拷贝数的基因座位，扩增结果应该显示基因座位之间的峰值相差不多。一些细胞系DNA可能存在突变，会影响基因座位之间等位基因峰值的均衡。一个细胞系的STR基因型随着细胞传代会出现变化。用户可以常规使用StemElite™ ID系统来监控细胞系STR基因型的变化。此外，在细胞系DNA里偶尔可以观察到一个基因座位存在三等位基因。

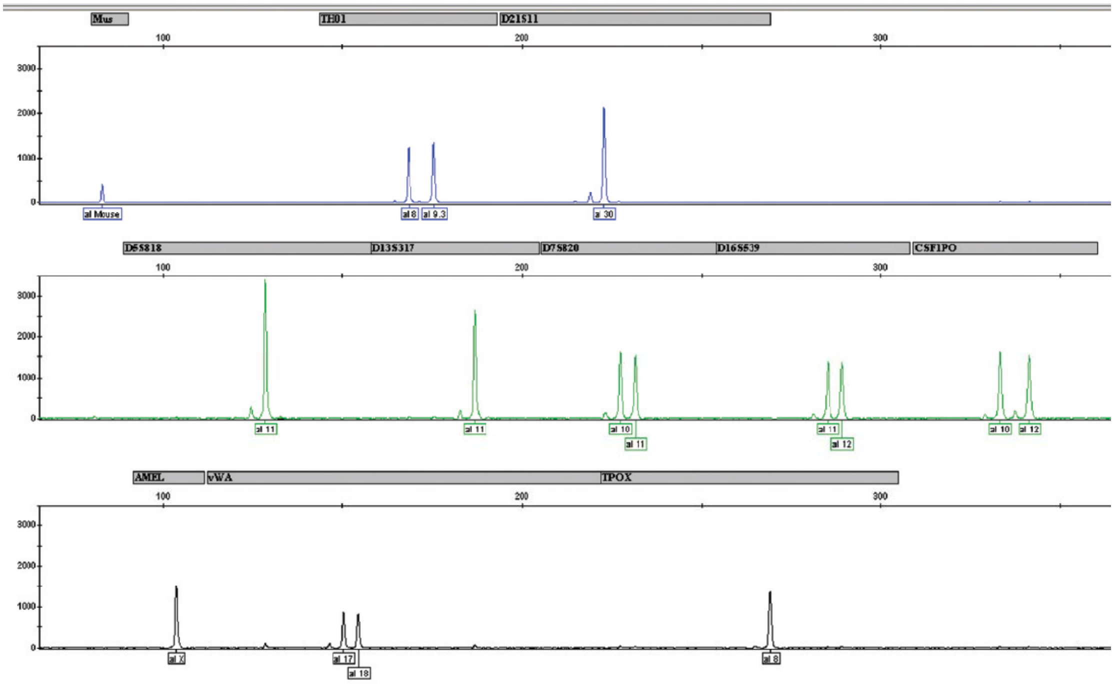

图6、**The StemElite™ ID**系统的典型数据。

人造峰（Artifacts）和扫描残迹（Stutter）

条带扫描残迹是使用STR分析技术经常产生的假象。条带扫描残迹经常可在真正的等位基因峰下游观察到，是一个重复峰，有时是两个重复峰小于或者是一个重复峰大于真正的等位基因峰。经常性地，拥有大量重复单元数目的等位基因会产生高频率的条带扫描残迹。同一个基因座位的扫描残迹的强度和表现方式随着引物对设置的不同而有些许不同。StemElite™ ID 系统中STR基因座位的扫描残迹情况在“PowerPlex® 16 System validation”已有描述（8）。

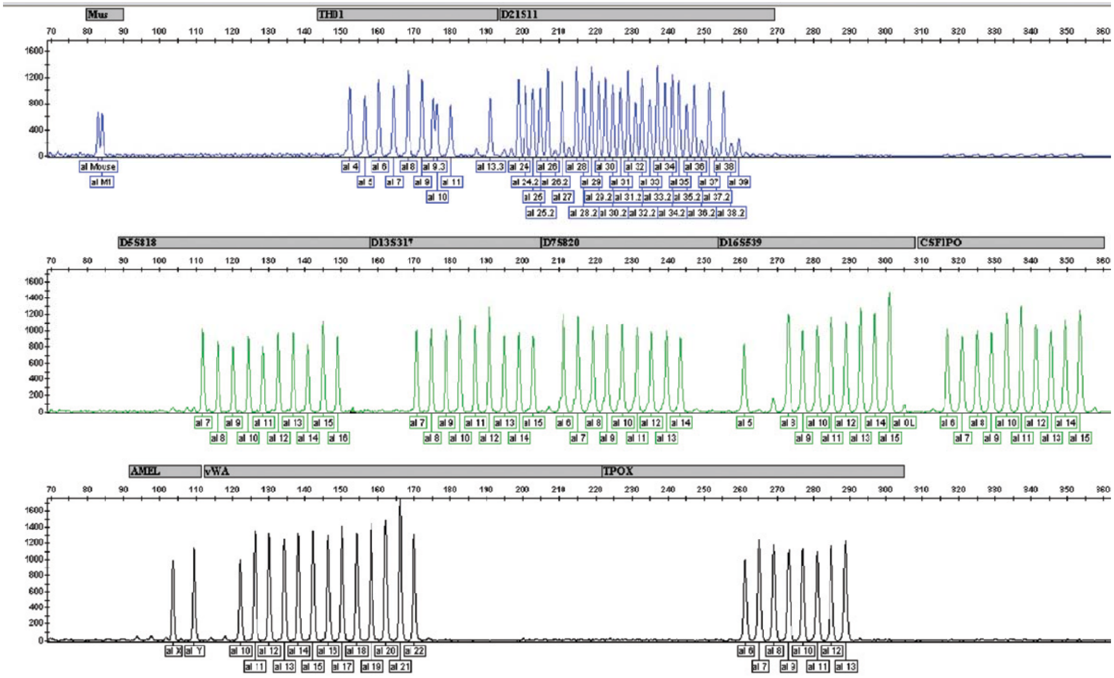

图7、**The StemElite™ ID等位基因分型标准物**

除了扫描残迹峰，其它的人造峰也能在StemElite™ ID 系统的一些基因座位处观察到。一些基因座位的n-2和n+2处（真正等位基因峰的上游或下游两个碱基处），能观察到小峰，如D21S11基因座位。样品也可能在D7S820和D13S317等位基因簇之间，鼠源和TH01等位基因簇之间，出现小峰。有时一个在等位基因分型标准物范围外的人造峰能在 JOE 染色通道270-271bp处观察到。一个或多个与扩增无直接联系的额外峰在 TPOX 等位基因上游8-26碱基处和 vWA 等位基因上游6-21碱基处都会观察到。在以下情况下都会导致这些额外峰的出现，扩增产物峰特别强（信号高或模板量多），甲酰胺、聚合物或毛细管质量差，或变性不完全。一个或多个与扩增无直接联系的额外峰会在荧光通道的73bp处和JOE通道的72-77bp处观察到。见第11节的常见问题及建议，获取更多信息来减少这些人造峰。

我们已经仔细选择了STR基因座位和引物来避免和减少人造峰的出现，包括那些与*Tag* DNA聚合酶有关的过程，如复制滑动(repeat slippage)和末端核苷酸添加。复制滑动（9,10），有时也叫 n-4 峰，条带扫描残迹或阴影带，是由于DNA扩增时一个重复单元的缺失，或者是DNA样品的体内突变，或者两个原因都有。观察到的假峰数量主要是由要扩增的基因座位和DNA序列决定的。末端核苷酸添加（11，12）会发生在*Tag* DNA聚合酶往扩增片段的3’端添加一个核苷酸时，一般是腺嘌呤，这种核苷酸添加与模板无关。这种添加发生的效率随着不同的引物序列会不同。因此，一个比预期值小一个碱基的人造峰（如丢失一个末端核苷酸添加）是有时能见到的。我们优化了引物序列，并在扩增流程中增加了一个30分钟的60

度延伸过程，来保证末端核苷酸基本上能全部添加上（当模板DNA用量为建议量时）（13）。微差异等位基因（等位基因的差异由于长度的不同而不是重复长度的不同）的存在使得等位基因的说明和指定变得更为复杂。多态性越大，微差异等位基因越多和突变率越高（14，15）。因此，D21S11拥有大量的，相对普遍的微差异等位基因。

CE仪器引起的人造峰有时在一个或所有的颜色通道都会看到。微小的电压起伏和尿素晶体，在激光通过时都会引起尖峰。尖峰有时仅在一种颜色中观察到，但是更多的是多种颜色中出现。再注入样品来进一步确认。

11、问题和建议

本手册没有提到的问题，请联系你所在区域的Promega分公司 chinatech@promega.com.cn，或经销商。

11.A、扩增反应和片段检测

现象	原因和评论
等位基因峰不明显或没有	模板DNA不纯。DNA提取步骤，样品来源，都可能导致DNA样品里存在抑制剂。 -- 模板不够。使用建议的模板DNA量。 -- 扩增反应程序不正确。确认扩增反应程序的正确性。 -- 盐浓度高或pH值改变。如果DNA样品保存在pH值不是8.0或含有高EDTA的TE缓冲液里，那么DNA样品使用体积不可超过总反应体积的20%。使用TE^{-4}缓冲液（10mM Tris HCl[pH8.0]，0.1mM EDTA）或无核酸酶水。 -- PCR仪器，平板或离心管问题。重新复习7.B小节部分的操作方法。我们没有检测其它的反应管，平板或PCR仪器。如果有必要，校正一下PCR仪器的加热模块。 -- 引物浓度过低。使用建议的引物浓度。在使用StemElite™ ID 10X 引物对混合物之前，先震荡15秒。混匀以后，不要离心引物对混合物。 -- CE注入差（也影响 ILS600 峰）。重新注入样品。检查系统是否渗漏。检查激光发生系统。 --

	甲酰胺质量差。跑样品时只使用Hi-Di™甲酰胺。 -- 如果DNA模板包含超过50%的鼠源DNA，人源DNA的峰值也会减弱。如果还想得到这样的细胞系的一个基因型，考虑使用一个无鼠源标记的细胞系STR系统，如Cell ID™ 系统（目录号：G9500）。
一种或多种颜色通道中出现额外峰	污染了另外一种模板DNA或之前扩增的DNA样品。交叉污染也会是一个问题。使用抗气溶胶的枪头，并经常换手套。 -- 样品没有完全变性。按照建议时间热变性处理样品，并立即在碎冰上或冰水浴中冷却，之后再上样。 -- STR扩增时产生的人造峰。STR系统的PCR扩增有时会产生比等位基因小的人造峰，一般峰值低。但如果样品过载，这些人造峰会变得很高。 -- CE仪器引起的人造峰（“spikes”）。微小的电压变化或尿素晶体，在激光通过时，会产生“spikes”。人造峰有时出现在一种颜色中，但更多的是在多种颜色中出现。再注入样品来进一步确定。 -- CE仪器引起的人造峰（污染物）。用于仪器使用或稀释10倍遗传分析器缓冲液所用的水里的污染物可能会在蓝色和绿色区域产生峰。使用灭菌水，更换玻璃瓶和清洗缓冲液存储器。 -- 由于使用过量DNA引起的高背景。使用少量的模板DNA，或者减少2-4个扩增程序里的循环数目（10/20或10/18循环数） -- 溢出峰值过高或使用的Matrix差或不正确。 ● 创建一个新的Matrix或进行光谱校正 ● 仪器的敏感度可能不同 优化注入条件。见8.B或9.B小节部分。 -- 长期将样品保存在甲酰胺中会引起样品降解。使用新鲜的甲酰胺重新准备样品。

	------------------------------------ CE聚合物超出使用有效期，或者室温保存聚合物超过一周。按照仪器生产商要求日常维护或定期使用仪器。
扩增后样品中出现沉淀	热启动相关的蛋白热变性可能形成沉淀。沉淀不会影响后续的扩增或毛细管电泳。
等位基因分型标准物与样品跑得不一样	确保等位基因分型标准物和样品在一台仪器上跑样。 ------------------------------------ 等位基因分型标准物注入不好。在每次跑样时，多用几条等位基因分型标准物。
峰值失衡	很多细胞系在多次传代后会出现峰值失衡。对于某些细胞系，该现象是正常的。 ------------------------------------ DNA过量。过量模板用于扩增，会导致峰值失衡，较小基因座位比较大基因座位更容易扩增出来。减少模板用量，或者减少2-4轮扩增反应循环数。 ------------------------------------ 降解的DNA样品。DNA样品被降解，较大基因座位产率减少。重新提纯模板DNA。 ------------------------------------ 各方面平衡问题。完全融化StemElite™ ID 10X 引物对混合物，使用前震荡15秒。混匀后，不要离心该引物对混合物。 ------------------------------------ 常规性的校正PCR仪器和移液器。 ------------------------------------ 模板DNA不纯。抑制剂能引起等位基因失衡。

11.B、GeneMapper® and GeneMapper® *ID* 分析软件

现象	原因和评论
无法调入等位基因	为了使用GeneMapper® *ID* 分析软件分析样品，分析参数和分子量大小标准必须都得有一致的分析类型“Basic或Advanced”，如果它们不同，就会出错。 -------------------------------------- 分子量内标600中的片断种类数目不够。确保至少有一条片断小于最小的样品峰，至少有一条片断大于最大的样品峰。

	-- 样品中的分子量内标没有被正确识别。手动重新定义样品中分子量内标片断的分子量大小。
偏离等位基因分型标准物	使用了与样品不同批次跑样的等位基因标准物。重新使用同批次跑样的等位基因分型标准物来分析样品。 -- GeneMapper® *ID* 分析软件需要导入来自样品数据所在文件夹的等位基因分型标准物。确保等位基因分型标准物与样品在同一文件夹。按照10小节部分描述创建一个新项目并重新分析。 -- 选择用于分析的panel文件不正确。使用正确的与StemElite™ ID 系统相应的panel文件。 -- 当使用GeneMapper® *ID* 分析软件时，等位基因分型标准物没有被识别为样品类型的等位基因分型标准物。 -- 样品中的分子量内标没有被正确定义。手动重新定义样品中分子量标准片断的分子量大小。 -- 当使用GeneMapper®分析软件时，bins文件可能需要根据仪器的迁移特性重新调整。使用自定义bin文件创建器。
分子量标准没有被正确的调入（图8）	10.C小节部分中选择的部分范围的数据起始点不正确。调整分析方法中的数据起始点。也可以使用全范围分析方法。 -- 跑样时间短，分子量内标的大片段没有检测到。不是所有的分子量内标600的标准片断峰在每次跑样中都会检测到。 ● 依据样品中存在的分子量标准片断创建一个新的分子量标准。 ● 延长跑样时间。
分子量标准峰缺失	如果峰值低于阈值，重新注入样品。 -- 如果峰质量低，重新定义分子量标准略过这些分子量标准峰。
错误信息：“Either panel,size Standard, or analysis	分子量标准和分析方法不在同一模式下（“Classic” vs“Basic or Advanced”）。

method is invalid”	确保两者文件设置成同一模式，要么Classic，要么Basic or Advanced。

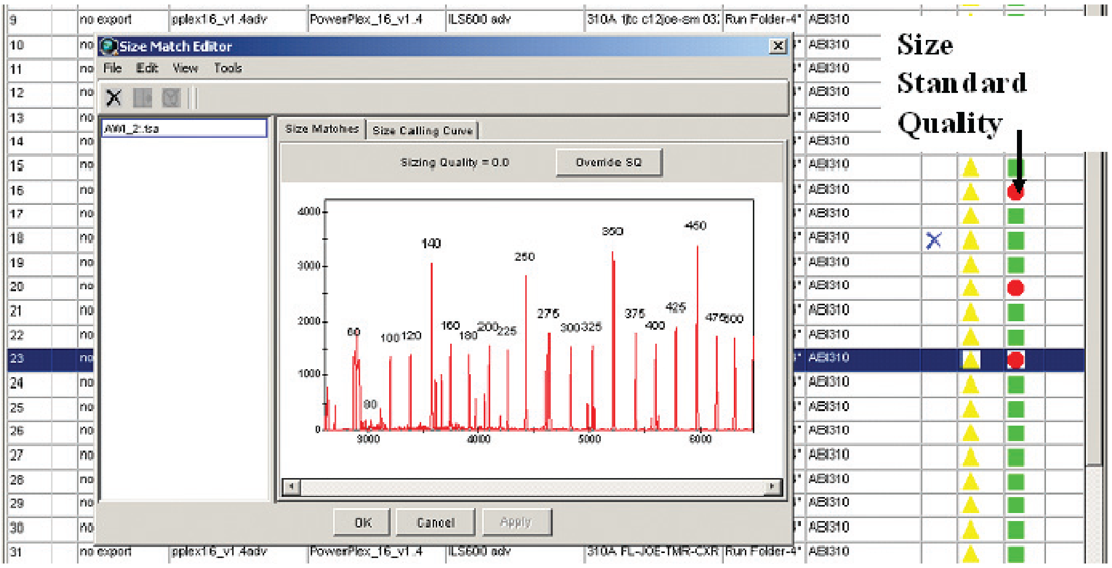

图8. 举例说明GeneMapper® *ID* 软件里分子量标准片断的不正确指定。

现象	原因和评论
没有等位基因调入，但是择 也没有错误信息显示	样品没有选择Panel或分子量标准。选 正确的选项，重新分析。 ----------------------------------- 分子量标准没有被正确指定，或分子量标准峰有丢失。重新检查分子量标准。
错误信息： “Both the Bin Set used in the Analysis Method and the Panel must belong to the same Chemistry Kit”。	错误的bin设置或缺失的bin设置。确保选择正确的bin设置，按图3或图4显示的。
显著上调的基线	ABI PRISM® 3100/3100-*Avant* Genetic Analyzers 和 Applied Biosystems 3130/3130xl genetic analyzers的光谱校正不好。重新做一个新的光谱校正，重新跑样。 ABI PRISM® 310 genetic analyzer的matrix文件不好，重做并优化matrix。 ----------------------------------- 使用“Classic”模式分析方法会比使用“Basic or Advanced”模式分析方法产生更多的噪音。推荐“Advanced”模式

	分析方法和分子量标准。
分析样品时出现红带，同时数据显示时会出现以下错误信息："Some selected samples do not contain analysis data. Those samples will not be shown".	如果使用ABI PRISM® 310 genetic analyzer仪器跑样，不给matrix文件，不会有数据显示。在用GeneMapper® *ID* 软件分析时应用matrix文件，重新分析。
尝试导入panel和bin文件时出现错误信息："Unable to save panel data: Java.SQLEException: ORA-00001: unique constraint (IFA.CKP_NNN) violated".	panel和bin文件里的不同设置有冲突。删掉所有的panel和bin文件，重新导入文件，使用不同的先后顺序。

12. 附录

12.A、STR 基因座位信息

更多由 StemElite™ ID 系统扩增的人类 STR 基因座信息见表 3，StemElite™ ID 系统等位基因分型标准物信息见表 4。

表3. StemElite™ ID系统基因座特异信息

STR基因座	标记	染色体位置	GenBank®基因座及基因座定义	重复序列[1] 5'→3'
D21S11	FL	21q11-21q21	HUMD21LOC	TCTA复合物(16)
TH01	FL	11p15.5	HUMTH01，人酪氨酸羟化酶基因	AATG(16)
Mouse[2]	FL	小鼠4号染色体	小鼠基因座近D4Mit113处	NA
TPOX	TMR	2p23-2pter	HUMTPOX，人甲状腺过氧化物酶基因	AATG
vWA	TMR	12p12-pter	HUMVWFA31，人血管假性血友病因子基因	TCTA复合物(16)
Amelogenin[3]	TMR	Xp22.1-22.3和Y染色体	HUMAMEL，人Y染色体类牙釉蛋白基因	NA
CSF1PO	JOE	5q33.3-34	HUMCSF1PO，人c-fms原癌基因编码CSF-1受体	AGAT
D16S539	JOE	16q24-qter	NA	GATA

D7S820	JOE	7q11.21-22	NA	GATA
D13S317	JOE	13q22-q31	NA	TATC
D5S818	JOE	5q23.3-32	NA	AGAT

[1]国际法医血液遗传学会DNA委员会(ISFH)在1997年8月的报告中指出，1）编码基因内部的STR基因座应在编码链中，另外，定义的重复序列基序应从重复基序的5'端可能的第一个核苷酸起始；2）对于与编码基因无关的STR基因座，应遵循第一个数据库或者原始文献描述。
[2]Mouse不是STR，但是会显示出小鼠特异性的条带。
[3]Amelogenin不是STR，但是会显示一个106个碱基的X特异性条带和112个碱基的Y特异性条带。
TMR=carboxy-tetramethylrhodamine 羧基四甲基罗丹明
FL=fluorescein 荧光素
JOE= 6-carboxy-4´,5´-dichloro-2´,7´-dimethoxyfluorescein 6-羧基-4´,5´-二氯-2´,7´-二甲氧基荧光素
NA=not applicable 不适用

表4. StemElite™ ID系统等位基因分型标准物信息

STR基因座	标记	等位基因分型标准物成分大小范围[1, 2]（碱基）	等位基因分型标准物成分重复数量
D21S11	FL	203-259	24, 24.2, 25, 26-28, 28.2, 29, 29.2, 30, 30.2, 31, 31.2, 32, 32.2, 33, 33.2, 34, 34.2, 35, 35.2, 36-38
TH01	FL	156-195	4-9, 9.3, 10-11,13.3
Mouse	FL	90, 91	(Mouse)
TPOX	TMR	262-290	6-13
vWA	TMR	123-171	10-22
Amelogenin	TMR	106,112	X, Y
CSF1PO	JOE	321-357	6-15
D16S539	JOE	264-304	5,8-15
D7S820	JOE	215-247	6-14
D13S317	JOE	176-208	7-15
D5S818	JOE	119-155	7-16

1每个等位基因分型标准物的长度已通过序列分析验证
2使用分子量内标，如Internal Lane Standard 600时，等位基因分型标准物成分计算值可能与列表中的数值有差异。这是因为等位基因分型标准物中不同的序列和分子量内标的成分可能导致迁移的差异。此外染料标签也会对等位基因迁移造成影响。

12.B、分子量内标600

分子量内标（ILS）600包含22个DNA片段，长度分别为60，80，100，120，140，160，180，200，225，250，275，300，325，350，375，400，425，450，475，500，550和600碱基。每个片段都标记了羧基-X-罗丹明（CXR）且可以在StemElite™ ID扩增试剂的存在下被单独检测出来（作为第四种颜色）。使用StemElite™ ID系统时，毛细管电泳上样过程中加入ILS600可以增加分析的准确性。分子量内标的准备和使用流程见第8和9部分。

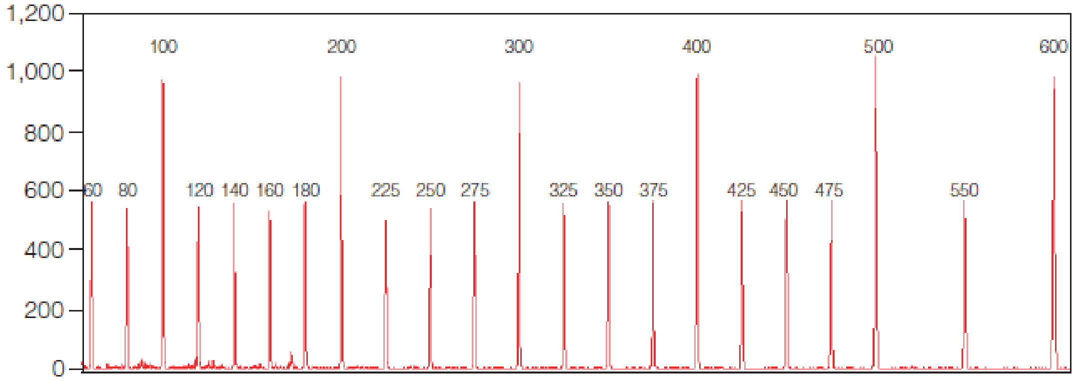

图9. 显示分子量内标600片段的电泳图谱。

12.C、StemElite™ ID系统Master Mix混合液准备

每一个PCR反应所需的混合液用量的工作表见表5。用反应数量乘以表中列出的每个反应的体积(μl)可以得到最终所需反应混合液的体积(μl).

表5. StemElite™ ID系统反应混合液用量

PCR Master Mix 混合液成分	单个反应体积	× 反应数量	= 最终体积（μl）
StemElite™ ID 5X Enzyme Mix 酶混合液	5.0μl	×	=
StemElite™ ID 10X Primer Pair Mix 引物对混合液	2.5μl	×	=
Water, Amplification Grade[1]	μl	×	=
每管		×	=
模板DNA体积（1-4ng）	最多17.5μl	×	=
总反应体积	25μl	×	=

[1]反应混合液与模板DNA体积之和应为25μl。根据模板DNA的体积用水补齐，使反应体系最终体积到25μl。

12.D 缓冲液和溶液配制

TE[-4]缓冲液（10mM Tris-HCl，0.1mM EDTA[pH8.0]）
2.21g Tris碱
0.037g EDTA（$Na_2EDTA\cdot 2H_2O$）
将Tris碱和EDTA溶解在900ml去离子水中，用HCl将溶液调至pH8.0，去离子水定容至1升。

12.E、相关文献

1. Chatterjee, R. (2007) Cell biology. Cases of mistaken identity. *Science* **315**, 928–31.
2. Ruiz Bravo, N. and Gottesman, M. (2007) Notice regarding authentication of cultured cell lines. This can be viewed online at: http://grants.nih.gov/grants/guide/notice-files/NOT-OD-08-017.html
3. Yoshino, K. *et al.* (2006) Essential role for gene profiling analysis in the authentication of human cell lines. *Human Cell* **19**, 43–8.
4. Szibor, R. *et al.* (2003) Cell line DNA typing in forensic genetics—the necessity of reliable standards. *Forensic Sci. Int.* **138**, 37–43.
5. Dirks, W.G. *et al.* (2005) Short tandem repeat DNA typing provides an international reference standard for authentication of human cell lines. *ALTEX* **22**, 103–9.
6. Masters, J.R. *et al.* (2001) Short tandem repeat profiling provides an international reference standard for human cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 8012–7.
7. (2001) Verify cell line identity with DNA profiling. *ATCC Connection: Newsletter of The American Type Culture Collection* **21**, 1–2.
8. Krenke, B. *et al.* (2002) Validation of a 16-locus fluorescent multiplex system. *J. Forensic Sci.* **47**, 773–85.
9. Levinson, G. and Gutman, G.A. (1987) Slipped-strand mispairing: A major mechanism for DNA sequence evolution. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 203–21.
10. Schlotterer, C. and Tautz, D. (1992) Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Res.* **20**, 211–5.
11. Smith, J.R. *et al.* (1995) Approach to genotyping errors caused by nontemplated nucleotide addition by *Taq* DNA polymerase. *Genome Res.* **5**, 312–7.
12. Magnuson, V.L. *et al*. (1996) Substrate nucleotide-determined non-templated addition of adenine by *Taq* DNA polymerase: Implications for PCR-based genotyping. *BioTechniques* **21**, 700–9.
13. Walsh, P.S., Fildes, N.J. and Reynolds, R. (1996) Sequence analysis and characterization of stutter products at the tetranucleotide repeat locus vWA. *Nucleic Acids Res.* **24**, 2807–12.
14. Moller, A., Meyer, E. and Brinkmann, B. (1994) Different types of structural variation in STRs: HumFES/FPS, HumVWA and HumD21S11. *Int. J. Leg. Med.* **106**, 319–23.
15. Brinkmann, B., Moller A. and Wiegand, P. (1995) Structure of new mutations in 2 STR systems. *Int. J. Leg. Med.* **107**, 201–3.
16. Griffiths, R. *et al.* (1998) New reference allelic ladders to improve allelic designation in a multiplex STR system. *Int. J. Legal Med.* **111**, 267–72.
17. Bär, W. *et al.* (1997) DNA recommendations: Further report of the DNA Commission of the ISFH regarding the use of short tandem repeat systems. *Int. J. Legal Med.* **110**,

175–6.
18. Gill, P. *et al.* (1997) Considerations from the European DNA Profiling Group (EDNAP) concerning STR nomenclature. *Forensic Sci. Int.* **87**, 185–92.

12.F、相关产品

样品准备系统

Product	Size	Cat.#
Wizard® SV Genomic DNA Purification System	50 preps	A2360
	250 preps	A2361
Wizard® Genomic DNA Purification Kit*	100 isolations × 300µl	A1120
	500 isolations × 300µl	A1125
	100 isolations × 10ml	A1620
MagneSil® Genomic, Fixed Tissue System*	100 samples	MD1490
DNA IQ™ System*	100 reactions	DC6701
	400 reactions	DC6700
Slicprep™ 96 Device*	10 pack	V1391

*For Laboratory Use.

Maxwell® 自动核酸纯化系统

Product	Size	Cat.#
Maxwell® 16 Cell LEV DNA Purification Kit*	48 preps	AS1140

For more information about other Maxwell® Nucleic Acid Purification Kits, visit: **www.promega.com/maxwell16/**

*For Laboratory Use.

附属产品

Product	Size	Cat.#
PowerPlex® Matrix Standards, 310*	50µl (each dye)	DG4640
PowerPlex® Matrix Standards, 3100/3130*	25µl (each dye)	DG4650
Internal Lane Standard 600**	150µl	DG1071
Water, Amplification Grade**	6,250µl (5 × 1,250µl)	DW0991
9947A DNA*	250ng (10ng/µl)	DD1001
Mouse Genomic DNA	100µg	G3091

*Not for Medical Diagnostic Use.

**For Laboratory Use.

细胞发育和细胞毒性验证

Product	Size	Cat.#
CytoTox-Glo™ Cytotoxicity Assay*	10ml	G9280
MultiTox-Fluor Multiplex Cytotoxicity Assay*	10ml	G9200
CytoTox-Fluor™ Cytotoxicity Assay*	10ml	G9260
CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay*	10ml	G7570

*For Laboratory Use. Additional Sizes Available.

凋亡验证

Product	Size	Cat.#
Apo-ONE® Homogeneous Caspase-3/7 Assay (fluorescent)	10ml	G7790
Caspase-Glo® 3/7 Assay*	10ml	G8091
Caspase-Glo® 8 Assay*	10ml	G8201
Caspase-Glo® 9 Assay*	10ml	G8211

*For Laboratory Use. Additional Sizes Available.

ART® 抗气溶胶枪头

Product	Volume	Size (tips/pack)	Cat.#
ART® 10 Ultramicro Pipet Tip	0.5–10µl	960	DY1051
ART® 20E Ultramicro Pipet Tip	0.5–10µl	960	DY1061
ART® 20P Pipet Tip	20µl	960	DY1071
ART® GEL Gel Loading Pipet Tip	100µl	960	DY1081
ART® 100 Pipet Tip	100µl	960	DY1101
ART® 100E Pipet Tip	100µl	960	DY1111
ART® 200 Pipet Tip	200µl	960	DY1121
ART® 1000E Pipet Tip	1,000µl	800	DY1131

(a)U.S. Pat. Nos. 5,843,660 and 6,221,598, Australian Pat. No. 724531, Canadian Pat. No. 2,118,048, Korean Pat. No. 290332, Singapore Pat. No. 57050, Japanese Pat. No. 3602142 and other patents pending.

(b)STR loci are the subject of U.S. Pat. No. RE 37,984, German Pat. No. DE 38 34 636 C2 and other patents issued to the Max Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften, e.V., Germany. The development and use of STR loci are covered by U.S. Pat. No. 5,364,759, Australian Pat. No. 670231 and other pending patents assigned to Baylor College of Medicine, Houston, Texas.

Patents for the foundational PCR process, European Pat. Nos. 201,184 and 200,362, expired on March 28, 2006. In the U.S., the patents covering the foundational PCR process expired on March 29, 2005.

(c)This product is sold under licensing arrangements with the USB Corporation. The purchase price of this product includes limited, nontransferable rights under U.S. Patent Application Serial Number 11/171,008 owned by the USB Corporation to use only this amount of the product to practice the claims in said patent solely for activities of end users within the fields of life science research and forensic analysis of genetic material relating to, or obtained as the result of, criminal investigations or disaster sites conducted either by or for a governmental entity, or for use in or preparation for legal proceedings, as well as the compilation and indexing of the results of such analysis, and also analysis for parentage determination (the "Forensic and Genetic Identity Applications Field"). The Forensic and Genetic Identity Applications Field specifically excludes tissue typing related to transplantation or other medical procedures. Further licensing information may be obtained by contacting the USB Corporation, 26111 Miles Road, Cleveland, Ohio 44128.

(d)This product is sold under licensing arrangements with Stratagene. The purchase price of this product includes limited, nontransferable rights under U.S. Pat. Nos. 5,449,603, 5,605,824, 5,646,019 and 5,773,257 owned by Stratagene to use only this amount of the product to practice the claims in said patent solely for activities of end users within the fields of life science research and forensic analysis of genetic material relating to, or obtained as the result of, criminal investigations or disaster sites conducted either by or for a governmental entity, or for use in or preparation for legal proceedings, as well as the compilation and indexing of the results of such analysis, and also analysis for parentage determination (the "Forensic and Genetic Identity Applications Field"). The Forensic and Genetic Identity Applications Field specifically excludes tissue typing related to transplantation or other medical procedures. Further licensing information may be obtained by contacting the Business Development Department, Stratagene California, 11011 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037.

© 2008 Promega Corporation. All Rights Reserved.

Apo-ONE, Caspase-Glo, CellTiter-Glo, MagneSil, Maxwell, PowerPlex and Wizard are registered trademarks of Promega Corporation. Cell ID, CytoTox-Fluor, CytoTox-Glo, DNA IQ, Slicprep and StemElite are trademarks of Promega Corporation.

ABI PRISM, GeneMapper, GeneScan and MicroAmp are registered trademarks of Applera Corporation. ART is a registered trademark of Molecular Bio-Products, Inc. GenBank is a registered trademark of U.S. Dept. of Health and Human Services. GeneAmp is a registered trademark of Roche Molecular Systems, Inc. Hi-Di and POP-4 are trademarks of Applera Corporation. Quant-iT is a trademark of Molecular Probes, Inc. PicoGreen is a registered trademark of Molecular Probes, Inc. Windows is a registered trademark of Microsoft Corporation.

Products may be covered by pending or issued patents or may have certain limitations. Please visit our Web site for more information.

All prices and specifications are subject to change without prior notice.

Product claims are subject to change. Please contact Promega Technical Services or access the Promega online catalog for the most up-to-date information on Promega products.